

L.-アスコルビン酸を基本骨格とした目的志向型ライブラリーの構築と新規ホスファターゼ阻害剤の探索

著者	住吉 紘一
号	50
学位授与番号	3585
URL	http://hdl.handle.net/10097/37253

氏 名	すみよしひろかず
授 与 学 位	住 吉 紘 一 博士 (工学)
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 生物工学専攻
学 位 論 文 題 目	L-アスコルビン酸を基本骨格とした目的志向型ライブラリーの構築と新規ホスファターゼ阻害剤の探索
指 導 教 員	東北大学教授 袖岡 幹子
論 文 審 査 委 員	主査 東北大学教授 袖岡 幹子 東北大学教授 正田 晋一郎 東北大学教授 熊谷 泉

論文内容要旨

第1章 序論

コンビナトリアルケミストリーとハイスループットスクリーニングは、医薬品開発においてリード化合物の効率的な探索手法として使用されている。ハイスループットスクリーニングは、ロボットによるスクリーニングの自動化により膨大な数のサンプルを短時間でスクリーニングすることを可能にした。コンビナトリアルケミストリーは、短期間に膨大な種類の化合物を合成することを可能にし、現在ではハイスループットスクリーニングに用いる化合物ライブラリーの構築には欠くことのできない手段となっている。これらの技術は新たなリード化合物発見までの大幅な期間短縮と、作業の自動化等による人件費等の削減などの期待に応えてきた。しかしながら、リード化合物の発見という点における成果は芳しいものとはいえないのが現状であり、その技術は未だ発展途上にあると考えられる。

コンビナトリアルケミストリーでは、固相合成法を用いて化合物を合成するのが一般的である。一般的に固相担体上で合成した化合物は、最後に固相担体から切り出す必要がある。目的とする化合物は切り出し操作の際に使用する試薬などの混合物となって得られるため、カラム精製などの精製操作が必要である。ハイスループットスクリーニングに用いられるライブラリーには高い純度が要求されるため、一般的な固相合成法を用いてライブラリーを構築する場合、最終工程で精製操作が必要となってしまう。このことは、短時間で多種類の化合物を合成する事ができるコンビナトリアルケミストリーの長所を十分に発揮する上で、重大な障害となっている。従って、精製操作を必要としない新たな合成法の開発が期待されている。ハイスループットスクリーニングによる化合物探索において活性化化合物発見の鍵となるのは、スクリーニングに使用する化合物ライブラリーである。効率的に化合物探索を行うには、活性化化合物がヒットする確率を上げることが重要である。つまり、「ランダム」だけではなく「確実な情報」を組み込んだライブラリーを構築することができれば活性化化合物のヒット率が上昇すると考えられる。そこで本研究では“目的志向型ライブラリー”の構築を検討した。目的志向型ライブラリーは特定の酵素に対してあらかじめ阻害活

性を有する「コア骨格」を導入することにより標的の酵素群に対するヒット率の上昇を狙ったライブラリーである。さらに、コア骨格にランダムに側鎖を導入し、コア骨格の類似構造を網羅的にスクリーニングすることにより対象となる酵素との結合部位の情報を得ることができると期待される。

第2章 固相担持試薬を用いた catch and release 型カーバメート合成法の開発

本章では化合物ライブラリーの構築に適用可能な固相担持試薬を用いた catch and release 型カーバメート合成法の開発について述べた。カーバメートは医薬や農薬として利用されている他、有機合成においてアミノ基の保護基として利用されている重要な骨格である。液相中におけるカーバメートの合成では副生成物や共生成物が生成するため精製操作が必要である。一方これまでに報告されている精製操作が不要である catch and release 型カーバメート合成法は、市販されている種類に限りがある

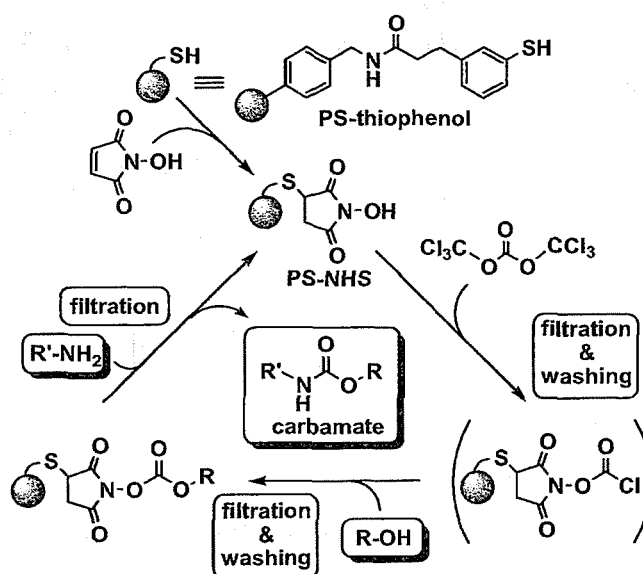


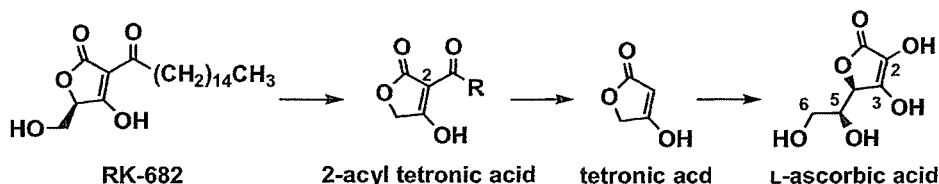
Fig. Carbamate Synthesis Using PS-NHS

クロロホルメートを原料に使用する。そのためどちらの合成法も、組み合わせを利用して多種類の化合物を合成し、なおかつ精製操作の簡略化が求められているコンビナトリアルケミストリーへの応用は困難である。そこで、原料にアルコールとアミンを用いる新たな catch and release 型カーバメート合成法の開発を検討した。その結果 Fig. に示すように、固相担持試薬 PS-NHS を用いた、簡便で汎用性の高いカーバメートの新規合成法を開発することに成功した。本合成法は、樹脂の濾過及び洗浄という簡便な操作のみで高純度のカーバメートを合成することが可能である。また、アルコール、フェノールとアミン、アニリン、アミノアルコールという入手容易な化合物を原料としているため、多種類の組み合わせのカーバメートを合成する事が可能であり、ライブラリー構築に応用する事が可能である¹⁾。

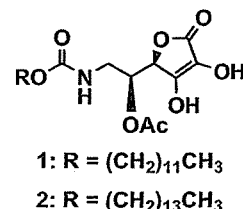
第3章 L-アスコルビン酸ライブラリーの構築と PTP/DSP 阻害剤の探索

本章では、第2章で述べた固相担持試薬を用いたカーバメート合成法を用いて L-アスコルビン酸ライブラリーの構築を行った事、さらにそのプロテインホスファターゼ阻害活性評価の結果について述べた。細胞内情報伝達を制御する機構としてタンパク質のリン酸化と脱リン酸化は非常に重要な働きをしている。プロテインホスファターゼとプロテインキナーゼは、タンパク質のリン酸化と脱リン酸化を行う酵素であることから、細胞内シグナル伝達機構研究において非常に注目されている酵素である。プロテインチロシンホスファターゼ(PTP)は、自己免疫疾患や癌、糖尿病などの疾病に関わっていることが知られており重要な

研究対象と
なっている
が、その働
きの大部分

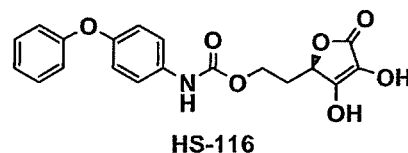


はまだ解明されていない。PTP のサブファミリーとして、リン酸化 Ser/Thr と
リン酸化 Tyr の両方を脱リン酸化する両特異性ホスファターゼ(DSP)がある。
PTP と DSP は一次構造的に共通部分が多いため、現在一般的に用いられている
ホスファターゼ阻害剤では個々の酵素を特異的に阻害することは非常に困難
である。従って個々の酵素の解析を効率的に進めるために、高い選択性を持つ



阻害剤の開発が求められている。PTP1B はプロテインチロシンホスファターゼ(PTP)の一種であり、II 型糖
尿病の原因因子であると考えられている。そのため PTP1B 阻害剤は II 型糖尿病治療薬の候補化合物として
注目されている。VHR は両特異性ホスファターゼ(DSP)の一種であり、MAP キナーゼの一種である ERK
を特異的に脱リン酸化する酵素である。VHR 選択的阻害剤の開発は ERK が関与する情報伝達系の解明に
大きく寄与することが期待される。そこで本研究では新たな PTP, DSP 阻害剤の開発を目指し、新たに開
発したカーバメート合成法を利用して化合物ライブラリーを構築し、阻害活性化合物を探索する事とした。
PTP と DSP の活性中心は、リン酸基を認識する高度に保存されたループ構造と、その周辺の unique site か
ら構成されていると考えられる。そこで我々は、コアとなるリン酸ミミック構造と種々のビルディングブ
ロックとを連結させた目的志向型ライブラリーを構築する事とした。

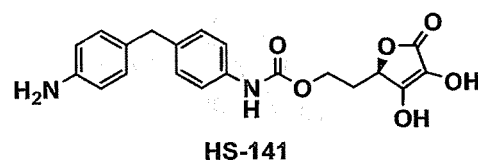
理研の Osada らによって発見された RK-682 は、PTP である CD45 や、VHR, Cdc25B といった DSP に対
し阻害活性を有することが報告されている。さらに RK-682 の構造活性相関と VHR とのドッキングシミュ
レーションの結果から、RK682 の 2-アシルテトロネ酸骨格部位が、リン酸ミミックとして相互作用してい
ることが示唆された。そこで本研究では 2-アシルテトロネ酸と同様に、テトロネ酸骨格を有する L-アスコ
ルビン酸がリン酸ミミックとして機能すると考えた。まず、化合物 1, 2 を合成してその阻害活性を評価し、
6 位にアルキル鎖を導入した L-アスコルビン酸が阻害剤となり得るか検討した。その結果、アスコルビン
酸骨格は目的志向型ライブラリーのコア骨格として適しており、6 位に種々の側鎖を導入する事によりそ
れぞれの酵素に対して阻害活性を調節できる可能性を見いだす事ができた。そこで次に、開発した固相試
薬を用いた catch and release 型の合成法を用いて、6 位に種々の側鎖を導入した L-アスコルビン酸カーバ
メート誘導体の目的志向型ライブラリーを構築し、PTP1B と
VHR に対する阻害活性を評価した。その結果、アルキル鎖を
持たずに阻害活性を有し、且つ VHR に有効な阻害活性を示す
HS-116 の開発に成功した。



第 4 章 活性と選択性の向上を目的とした二次ライブラリーの構築

本章では第 3 章に述べた結果をもとに、合成したライブラリー化合物の中で優れた活性を示した化合物

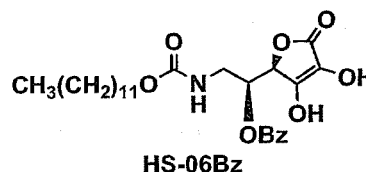
に着目し、計算科学的手法を用いて PTP1B および VHR との相互作用を推定し、それをもとに新たな 2 次ライブラリーの構築を行ない評価した結果について述べた。2 次ライブラリーは、目的志向型ライブラリーを用いたスク



リーニングで高い阻害活性が見られた化合物を、計算科学的手法を用いて構造修飾した化合物群である。本研究では、VHR に対して IC_{50} が 4~6 μ M と高い阻害活性を示した **HS-116** の骨格を基に二次ライブラリーを構築する事とした。**HS-116** と VHR とのドッキングシミュレーションと、計算により得た相互作用マップから、**HS-116** の修飾部位を決定した。構築した二次ライブラリーを用いて再度 PTP1B と VHR に対する阻害活性を評価した。その結果、PTP1B に対して選択性を示す化合物 **HS-141** を見いだす事に成功した。

第 5 章 L-アスコルビン酸ライブラリーを用いたホスファターゼ阻害剤の探索

本章では第 3 章でプロテインホスファターゼ阻害剤を志向して構築した L-アスコルビン酸ライブラリーを用いて、プロテインホスファターゼとは異なるファミリーに属するホスファターゼであるイノシトールモノホスファターゼに対する評価を行った結果について述べた。*myo*-inositolmonophosphatase (IMPA) はホスファチジルイノシトールシグナル伝達系においてリン酸化イノシトールを脱リン酸化する酵素である。現在 IMPA には IMPA1 と IMPA2 の 2 種類の酵素が知られており、そのうち IMPA1 は躁鬱病といった精神神経の疾病に関与していることが報告されている。一方、IMPA2 はその働きは未だ解明されていない。また現時点では IMPA1 の阻害剤として塩化リチウムなどのリチウムイオンを含む化合物が使用されているが、IMPA2 を阻害する化合物は見いだされていない。そこで、これまでに構築したリン酸ミミックライブラリーである、L-アスコルビン酸ライブラリーを用いて、IMPA2 阻害剤探索を行った。その結果、IMPA2 に有効な **HS-06Bz** を発見することに成功した。



総括

本研究をまとめると、まず、固相試薬を用いた精製操作を必要としないカーボメート合成法を開発した。また、その合成法を用いて L-アスコルビン酸をコアとする目的志向型ライブラリーを構築し、PTP1B, VHR に対する阻害剤の探索を行った結果、VHR に選択的な阻害剤 **HS-116** を開発することに成功した。さらに、**HS-116** を基本骨格とした二次ライブラリーを構築し PTP1B 選択的阻害剤 **HS-141** を開発した。また、この目的志向型ライブラリーをイノシトール脱リン酸化酵素の阻害剤探索に適用し、これまで阻害剤が知られていなかった IMPA2 に有効な阻害剤を見いだすことに成功した。本ライブラリーは、脱リン酸化酵素阻害剤のリード化合物を見いだすためにも利用できることを示すことができた。コア骨格という概念に基づいて構築した目的志向型ライブラリーは、阻害剤探索に非常に有効であり、今後は、様々な酵素ファミリーに対して適したコアを選択することで効率的な阻害剤探索を行うことができると考えている。

論文審査結果の要旨

医薬開発において、優れた生物活性をもつ化合物を見出す手段として、コンビナトリアルケミストリーを駆使した化合物ライブラリーの合成とハイスループットスクリーニングは、非常に重要な位置をしめるようになってきている。しかしランダムライブラリーから目的とする活性をもつ化合物を見出すヒット率は非常に低く、いかにその効率をあげるかが問題であった。標的とする酵素ファミリーを明確に定めてライブラリー設計を行なう目的志向型ライブラリーアプローチは、この問題に対するひとつの答えである。本論文は、目的志向型ライブラリー構築のための新しい方法として、固相担持試薬を用いたカーバメート合成法の開発を行い、さらにそれを用いたプロテインチロシンホスファターゼ阻害剤を志向した化合物ライブラリーの構築と評価を行った結果についてまとめたものである。

本論文は全編5章より構成されている。

第1章は序論であり、本研究の背景となるコンビナトリアルケミストリーやライブラリーについて述べている。

第2章は固相担持試薬を用いた catch and release 型カーバメート合成法の開発について述べている。

第3章はアスコルビン酸ライブラリーの構築とそのプロテインホスファターゼ阻害活性評価の結果について述べている。蛋白質のリン酸化、脱リン酸化による蛋白質の機能制御は、細胞内情報伝達において非常に重要な働きをしている。蛋白質の脱リン酸化を触媒するのが、プロテインホスファターゼであり、多くの種類のプロテインホスファターゼがそれぞれ固有の役割を担っている。本論文では、プロテインチロシンホスファターゼ阻害剤に的を絞った化合物ライブラリーとして、L-アスコルビン酸をコア構造とするライブラリーを設計し、第2章で述べた精製操作を必要としない効率の良い独自の方法を用いて合成した。さらにライブラリー化合物の、チロシンホスファターゼ PTP1B および両特異性ホスファターゼ VHR に対する阻害能を評価した結果、優れた阻害活性を示すものが見出された。

第4章は第3章に述べた結果をもとに、合成したライブラリー化合物の中で優れた活性を示した化合物に着目し、計算化学的手法を用いて PTP-1B および VHR との相互作用を推定し、それをもとに新たな2次ライブラリーの構築を行ない評価した結果について述べている。

第5章はプロテインホスファターゼ阻害剤を志向して構築したアスコルビン酸ライブラリーの、さらなる可能性を検証すべく、プロテインホスファターゼとは異なるファミリーに属するホスファターゼであるイノシトールモノホスファターゼに対する評価を行なった結果について述べている。これまで阻害剤が知られていなかった本酵素に対し、阻害活性を示す化合物を見出すことに成功した。このことは、構築したアスコルビン酸ライブラリーが、プロテインチロシンホスファターゼファミリー酵素のみでなく、ひろく類縁ホスファターゼの阻害剤を探索する上でも、たいへん優れたライブラリーであることを実証したものであり、高く評価できる。

以上要するに本論文は、ライブラリー構築のための新しい方法論の開発を行い、実際にアスコルビン酸ライブラリーを構築してその有効性を実証し、さらにライブラリーの中から実際にホスファターゼ阻害剤を見出しており、今後さまざまなライブラリー合成やホスファターゼの機能解明に関する研究に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。